



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 00860**

(22) Data de depozit: **01.09.2011**

(41) Data publicării cererii:
28.09.2012 BOPI nr. **9/2012**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLATARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE BUCUREȘTI-
CENTRUL DE CERCETĂRI BIOLOGICE,
"STEJARUL" PIATRA NEAMȚ,
STR. ALEXANDRU CEL BUN NR. 6,
PIATRA NEAMȚ, NT, RO**

(72) Inventatori:
• **DĂNILĂ DOINA, STR. SOMEȘ NR. 22,
PIATRA NEAMȚ, NT, RO;**
• **ȘTEFĂNACHE CAMELIA PAULA,
ALEEA ULMILOR NR. 36, BL. B29, AP. 59,
PIATRA NEAMȚ, NT, RO;**

• **GILLE ELVIRA, STR. PLEVNEI NR. 4,
BL. F10, SC. C, AP. 51, PIATRA NEAMȚ,
NT, RO;**
• **NECULA RADU, BD. TRAIAN NR. 2,
BL. S1, SC. E, AP. 151, PIATRA NEAMȚ,
NT, RO;**
• **DRUȚU ADINA CĂTĂLINA,
STR. DUMBRAVA ROȘIE NR. 5, BL. 8,
SC. C, AP. 41, ROMAN, NT, RO;**
• **TROTUȘ ELENA, ALEEA VASILE LUPU
NR. 23, ROMAN, NT, RO;**
• **APROTOSOAIIE ANA CLARA,
ȘOS. NAȚIONALĂ NR. 76, BL. C4, SC. A,
ET. 3, AP. 3, IAȘI, IS, RO;**
• **MIRON ANCA, ALEEA DOMENII NR. 23,
IAȘI, IS, RO;**
• **CIOANCĂ OANA,
STR. PROF. EMIL HONORIU NR. 16D, IAȘI,
IS, RO**

(54) **PROCEDEU DE MICROPROPAGARE LA SPECIA *VERONICA
OFFICINALIS L.* PRIN CULTURI DE ȚESUTURI**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de micro-propagare *in vitro*, prin culturi de țesuturi, a speciei *Veronica officinalis L.*, cu obținerea, în timp scurt, a unui număr mare de regeneranți cu rată mare de supraviețuire, pe un mediu de cultură Murashige și Skoog (1962) (MS), cu 25 mg/l zaharoză, 7,5...8,0% agar, fără regulatori de creștere pentru inițierea culturii și suplimentat cu 1,0 mg/l BAP (B10), 2,0 mg/l BAP

(B20), respectiv, 1,0 mg/l BAP și 0,3 mg/l ANA pentru multiplicarea și creșterea tulpinilor neoformate, pentru inducerea rizogenezii utilizându-se mediu MS fără regulatori de creștere, respectiv, mediu MS suplimentat cu 0,5 mg/l ANA.

Revendicări: 6

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



8

PROCEDEU DE MICROPROPAGARE LA SPECIA *VERONICA OFFICINALIS* L. PRIN CULTURI DE TESUTURI

Autori: Danila Doina, Stefanache Camelia Paula, Gille Elvira, Necula Radu,
Drutu Adina Catalina, Trotus Elena, Aprotosoia Ana-Clara, Miron Anca, Cioanca Oana

DESCRIEREA INVENTIEI

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. <i>a 2011 00860</i>
Data depozit <i>01-09-2011</i>

Inventia se refera la utilizarea biotehnologiilor cu aplicatie eficienta in micropropagarea plantelor medicinale de interes economic. Prezenta inventie se constituie ca procedeu de multiplicare *in vitro* a plantelor de de *Veronica officinalis* - pe variante ale mediului de cultura MS (Murashige si Skoog, 1962), prin utilizarea meristemelor (raceme si tulpini) ca explante de initiere a culturii. Procedeu asigura un randament crescut de obtinere, in timp scurt, a unui numar mare de regeneranti.

Este cunoscut ca exista preocupari pentru introducerea in cultura la *V. officinalis*., datorita importantei si potentialului de valorificare industriala a acesteia. Cererea de materie prima vegetala se bazeaza – in practica recenta, pe colectarea din mediul natural si pe producerea *ex-situ* in agro-ecosisteme (Németh, 2000).

Este cunoscut ca la *V. officinalis*, specie traditional medicinala, valorificarea surselor vegetale pentru compusi fenolici si iridoid glicozide – compusii polifunctionali cu spectru larg de actiune asupra organismelor vii, este de actualitate datorita activitati biologice a acestora, ce le face valoroase pentru industriile farmaceutica, cosmetica si alimentara (Crisan *et al.*, 2007; Tundis *et al.*, 2008; Valyova *et al.*, 2009). La plantele de *V. officinalis* din populatii naturale, diferentele fenotipice constand in variatii ale continutului in principii active, se pot datora autoecologiei fiecarui ecotip sau populatii, ce consta in diferente ale compozitiei organelor vegetative in micro- si macroelemente si efectului morfologic al radiatiilor luminoase din habitat (DALE et CAUSTON, 1992).

Este cunoscut faptul ca desi, cultivarea plantelor ofera avantajul standardizarii materiei prime vegetale, introducerea in cultura a speciilor provenite din habitatele naturale (heterogene morfo-fenologic si fitochimic), este un proces de durata ce poate fi accelerat prin selectie

corespunzatoare (Franke,1999, citat de Németh, 2000). Cultura de tesuturi la *V. officinalis*, poate constitui o tehnica complementara in ameliorarea si selectia - intr-o perioada mai scurta de timp a bioformelor cu cresterea lastarilor preponderent verticala, aspect important in realizarea culturilor conventionale si recoltarea materialului vegetal (*herba*).

Este cunoscut ca utilizarea micropropagarii confera, comparativ cu metodele conventionale de cultura, avantajul obtinerii unui material vegetal uniform, liber de viroze/bacterioze, precum si a unui numar relativ mare de indivizi intr-un interval scurt de timp.

Este cunoscut, din literatura de specialitate, ca au fost dezvoltate diferite procedee de multiplicare *in vitro* la alte specii ale genului *Veronica* in studii de transformare genetica, conservarea germoplasmei, propagarea formelor horticole. La *V. montana* L., pentru care s-a folosit ca sursa de explant apexurile caulinare s-a realizat o multiplicare moderata (Klavina *et al.*, 2004). Holobiuc *et al.* (2008), au elaborat un protocol de multiplicare in scopul conservarii *ex situ* a speciei rare *V. multifida ssp. capsellcarpa* (Dubrovik) A. Jelen, utilizand ca surse de explant fragmente de tulpini uninodale si inflorescente tinere. Pentru *V. anagallis-aquatica* L., a fost elaborat un protocol de multiplicare, utilizand ca sursa de explant segmente nodale cultivate pe mediu de cultura lichid - fara agar, protocol adecvat pentru a fi utilizat si in tehnicile de transformare (Shahzad *et al.*, 2011). Prin tehnica culturii de tesuturi, se propaga plante de *V. spicata* (soiul decorativ "Red Fox"), pentru asigurarea descendintilor cu caracteristici horticole identice (Stapfer *et al.*, 1985).

Problema pe care o rezolva inventia noastra consta in realizarea unei metode eficiente de de multiplicare *in vitro* a plantelor de *Veronica officinalis*, prin care se asigura un randament crescut de obtinere, in timp scurt, a unui numar mare de regeneranti. Procedetul de micropropagare asigura obtinerea de regeneranti plecand de la plante donor cu caracteristici fitochimice cunoscute si are aplicabilitate in ameliorare, selectie si obtinerea materiei vegetale standardizate, la specia mentionata, prin culturi conventionale.

Procedetul utilizat pentru realizarea culturilor *in vitro* conform inventiei consta in initierea culturii *in vitro*, prin utilizarea explantelor meristematice prelevate de la plante donor de *Veronica officinalis* – provenite din populatii naturale. Au fost inoculate explante ce au constat in muguri apicali si axilari (tulpini, raceme). Pentru realizarea culturilor *in vitro* a fost utilizat mediul

bazal MS (Murashige si Skoog, 1962), suplimentat cu diferite tipuri si cantitati de regulatori de crestere – auxine si citochinine.

Evaluarea fitochimica a fitocomplexului si a claselor de principii active analizate (compusi polifenolici, terpenici si iridoid glicozide, s-a realizat prin metodele CSS (Cromatografie in Strat Subtire) si RP-HPLC-UV (Cromatografie de Lichide de Inalta Performanta, cu Faza Inversa si detector UV - Agilent Technologies 1200 Series) pentru extracte metanolice epuizate – compusi polifenolici si derivati ai acizilor polifenolici; extractele diclormetanice au fost analizate prin CSS (calitativ) pentru compusii terpenici. Totalul compusilor iridoidici s-a dozat spectrofotometric, fiind exprimat in 8 acetil harpagida (g% s.u.).

Probele analizate au constat in material vegetal (*herba*) prelevat de la plantele donor colectate din populatii naturale si material vegetal provenit de la regenerantii obtinuti prin micropropagare.

La probele analizate (proba medie) s-a inregistrat un total al compusilor iridoidici comparabil pentru plantele donor (0,154g% s.u.) si cele regenerate *in vitro* (0,154 g% s.u.).

Conform cu standardele utilizate, analiza HPLC a identificat si cuantificat in extractele plantelor analizate (proba medie) prezenta unor derivati de apigenina, luteolina (2,3483 g% s.u. la plantele donor, respectiv 2,3080 g% s.u. la plantele regenerate) si acid cafeic (4,0156 g% s.u. la plantele donor, respectiv 3,7831 g% s.u. la plantele regenerate).

Ca posibile utilizari practice imediate, mentionam producerea de material vegetal/material saditor uniform, in flux continuu - indiferent de factorii climatici, cu caracteristici bioproductive/biosintetice superioare (prin selectia si perpetuarea ecotipurilor valoroase) – standardizarea materiei vegetale obtinuta in agrosisteme prin culturi in camp; procedeul poate fi aplicat ca parte integrata in strategiile de conservare *in situ* si *ex situ* pentru valorificarea sustenabila a acestei specii; reducerea perioadei de ameliorare si selectie a bioformelor cu cresterea lastarilor preponderent verticala, aspect important in realizarea culturilor conventionale si recoltarea materialului vegetal (*herba*).

Din aceste considerente, abordarea biotehnologica este o alternativa la propagarea si conservarea resursei vegetale, dar si de valorificare a principiilor biologice active.

Inventia prezinta urmatoarele avantaje:

- Are utilizari practice imediate prin producerea de material saditor cu caracteristici fitochimice cunoscute, pentru realizarea si standardizarea - in agrosisteme a materiei vegetale obtinute prin cultura in camp la *Veronica officinalis*;

- Procedeeul poate fi aplicat ca parte integrata in strategiile de conservare *in situ* si *ex situ* pentru valorificarea sustenabila a acestei specii;

- Are utilitate in studii fundamentale privind biosinteza compusilor biologic activi si in studii teoretice si aplicative de chemotaxonomie;

- Se obtine un numar mare de indivizi regenerati, intr-un intervalde timp relativ scurt, circa 50-60 indivizi/flacon de initiere/in 12-14 saptamani de cultura, cu rata de supravietuire de 85-90% la transferul in camp.

- Procedeeul are un numar redus de etape;

- Procedeeul poate contribui la reducerea perioadei de ameliorare si selectie a bioformelor cu cresterea lastarilor preponderent verticala, aspect important in realizarea culturilor conventionale si recoltarea materialului vegetal (*herba*).

Exemplu de realizare a inventiei

Se da in continuare un exemplu de realizare a inventiei:

Materialul vegetal utilizat pentru initierea culturii *in vitro*, este reprezentat de plante donor de *Veronica officinalis* – prelevate din populatii naturale. Au fost inoculate explante ce au constat in muguri apicali si axilari (tulpini, raceme).

Mediile de cultura consta in variante ale mediului bazal MS (25 g/l zaharoza, 7.5 – 8.0% agar), repartizat in flacoane Erlenmeyer de 100 ml (25 ml mediu/flacon) si apoi sterilizat (autoclavat la 120°C timp de 15 minute. Regulatorii de crestere sunt adaugati in mediu (acolo unde a fost cazul) anterior autoclavarii. Pentru initierea culturii se foloseste mediul MS fara regulatori de crestere; variantele utilizate pentru multiplicarea si cresterea lastarilor regenerati sunt suplimentate cu 1,0 mg/l BAP¹ (B₁₀), 2,0 mg/L BAP (B₂₀), respectiv 1,0 mg/l BAP si 0,3 mg/L ANA² (BN); pentru inducerea rizogenezei se utilizeaza mediul MS fara regulatori de crestere, respectiv mediul MS suplimentat cu 0,5 mg/l ANA (MSN).

¹Benzil-amino-purina, ²Acid naftalen acetic.

Condițiile de cultura sunt: fotoperioada de 16 ore lumina și 8 ore întuneric, la o temperatură $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

Inițierea culturii. Izolarea aseptica a explantelor se realizează cu clorura mercurică 0,1%, timp de 10, respective 15 minute – în funcție de gradul de contaminare a plantelor donor. Se inoculează 3 – 4 explante/flacon.

Multiplacarea și creșterea tulpinilor regenerante. După 4 săptămâni de la inițierea culturii, explantele sunt transferate pe mediile de multiplicare B₁₀, B₂₀ și BN. Se obțin aproximativ 4 – 5 lastari/explant; subcultivarile se realizează la 2 – 3 săptămâni.

Inducerea rizogenezii. Pentru inducerea rizogenezii, se repică tulpinile, și se inoculează 1 tulpina/flacon (mediile MS fără regulatori de creștere, respectiv MSN). După 3 – 4 săptămâni rizogeneză se definitivează (randament de 90 – 95%). Reducerea densității lastarilor și creșterea concentrației de agar din mediu, asigură obținerea lastarilor cu aspect caracteristic și reduce riscul de vitrificare a tesuturilor.

Aclimatizarea și transferul în câmp al regeneranților. Aclimatizarea la condițiile *ex vitro* se realizează în două etape: în sistem hidroponic timp de 2 săptămâni, ulterior aceștia fiind transferați în ghivece cu sol steril, fiind acoperiți cu pahare transparente – ulterior îndepărtate progresiv, pentru a asigura o atmosferă constantă, saturată în vapori. 4 – 5 săptămâni de acomodare, regeneranții pot fi transferați în câmp, unde se aplică lucrări de mentinere caracteristice speciei. Aclimatizarea regeneranților la condițiile *ex vitro* se realizează în condiții optime în lunile Martie – Aprilie, iar transferul în câmp trebuie să coincidă cu începutul perioadei de vegetație a speciei.

Prin tehnica multiplicării *in vitro* se obțin circa 50-60 indivizi/flacon de inițiere/în 12-14 săptămâni de cultură.

Bibliografie

- Crisan, G., Tamas, M., Miclaus, V., Krausz, T., Sandor, V. 2007. A comparative study of some *Veronica* species, Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 111, 280-284.
- Dale, M.P., Causton, D.R. 1992. The Ecophysiology of *Veronica chamaedrys*, *V. montana* and *V. officinalis*. IV. Effects of Shading on Nutrient Allocations - A Field Experiment, Journal of Ecology, 80, 517-526.
- Danila D., Stefanache C., Drutu C., Trotus E., 2011. Conventional and unconventional techniques for *in situ* conservation and capitalization in agro-systems of *Veronica officinalis* L., Acta Horticulturae, In press.
- Holobiu, I., Blindu, R., Carasan, M., Helepciuc, Fl., Voichita, C., Negrean, G. 2008 *In vitro* conservation strategy in *Veronica multifida* ssp. *capsellicarpa* (Dubovik) A. Jelen, Rom. J. Biol. Plant Biol., Bucharest, 53(2), 71-81.
- Klavina, D., Gailite, A., Jakobsone, G., Necajeva, J., Gavriloza, G., 2004. Tissue culture technology in conservation of threatened plant species of Latvia, Acta Universitatis Latviensis, Biology, 2004, 676, 183-188.
- Németh, E. 2000. Needs, problems and achievements of introduction of wild growing medicinal plants into the agriculture, Proceedings of the I CMAPSEEC & VI Meeting "Day of Medicinal Plants – 2000", Belgrade 1-10.
- Shahzad, A., Parveen, S., Fatema M. 2011, Development of a regeneration system via nodal segment culture in *Veronica anagallis-aquatica* L. - an amphibious medicinal plant, Journal of Plant Interactions, 6(1), 61-68
- Stapfer, R.E., Heuser, C.W., Deneke, C.F. 1985. Rapid multiplication of *Veronica* "Red Fox" propagated *in vitro*, Horticulture, 20, 866-867
- Tundis, R., Loizzo, M.R., Menichini, F., Statti, G.A., Menichini, F. 2008. Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments, Mini Rev Med Chem, 8 (4), 399-420.
- Valyova, M., Hadjimitova, V., Stoyanov, S., Ganeva, Y., Traykov, T., Petkov, I. 2009. Free radical scavenging activity of extracts from Bulgarian *Veronica officinalis* L. and GC-MS analysis of ethanol extract. The Internet Journal of Aesthetic and Antiaging Medicine, 2(1).

PROCEDEU DE MICROPROPAGARE LA SPECIA *VERONICA OFFICINALIS* L. PRIN CULTURI DE TESUTURI

Autori: Danila Doina, Stefanache Camelia Paula, Gille Elvira, Necula Radu,
Drutu Adina Catalina, Trotus Elena, Aprotosoia Ana-Clara, Miron Anca, Cioanca Oana

REVENDICARI

1. Procedeu de micropropagare **este caracterizat prin aceea ca** asigura multiplicarea plantelor de *Veronica officinalis*, prin culturi de tesuturi initiate din explante meristemice, pe variante ale mediului bazal MS (Murashige si Skoog, 1962), si obtinerea de regeneranti plecand de la plante donor cu caracteristici fitochimice cunoscute cu aplicabilitate in ameliorare, selectie si obtinerea materiei vegetale standardizate, la specia mentionata, prin culturi conventionale.
2. Procedeu definit in revendicarea 1 **este caracterizat prin aceea ca** pentru initierea culturii *in vitro* – de micropropagare am utilizat ca explant, meristeme din muguri apicali si axilari (tulpini si raceme) provenite de la plante donor cu caracteristici fitochimice cunoscute.
3. Procedeu de cultivare *in vitro* definit in revendicarea 1 **este caracterizat prin aceea ca** este constituit din urmatoarele etape: izolarea aseptica a explantelor si initierea culturii; multiplicarea si cresterea tulpinilor neoformate; rizogeneza la nivelul lastarilor; aclimatizarea si transferul in camp.
4. Procedeu conform cu revendicarea 3 **este caracterizat prin aceea ca** mediul utilizat pentru multiplicarea *in vitro* este reprezentat de mediul bazal Murashige Skoog (MS, 25 g/l zaharoza, 7,5-8,0 % agar): fara regulatori de crestere pentru initierea culturii; suplimentat cu 1,0 mg/l BAP¹ (B₁₀), 2,0 mg/L BAP (B₂₀), respectiv 1,0 mg/l BAP si 0,3 mg/L ANA² (BN) pentru multiplicarea si cresterea tulpinilor neoformate; pentru inducerea rizogenezei se utilizeaza mediul MS fara regulatori de crestere, respectiv mediul MS suplimentat cu 0,5 mg/l ANA (MSN).
5. Procedeu definit, conform cu revendicarea 4 este **caracterizat prin aceea ca** adaosul optim de regulatori de crestere pentru multiplicarea si cresterea lastarilor neoformati este de 1,0 mg/l BAP si 0,3 mg/L ANA².
6. Procedeu definit, conform cu revendicarea 4 este **caracterizat prin aceea ca** rizogeneza la nivelul lastarilor neoformati se realizeaza, cu randament superior, pe varianta de mediu MS suplimentat cu 0,5 mg/l ANA (MSN).

¹Benzil-amino-purina, ²Acid naftalen acetic.